



## Doctoral Thesis

# Interactions of cerium dioxide nanoparticles with the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: influence of physico-chemical characteristics and cerium(III)

**Author(s):**

Röhder, Lena Alix

**Publication Date:**

2014

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010207691> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 21790

**Interactions of cerium dioxide nanoparticles with the green alga  
*Chlamydomonas reinhardtii*: influence of physico-chemical  
characteristics and cerium(III)**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by  
Lena Alix Röhder  
Dipl. Biol., University Bremen

born on February, 26<sup>th</sup>, 1984 in Lüdenscheid  
citizen of Germany

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Laura Sigg, examiner  
Prof. Dr. Bernhard Wehrli, co-examiner  
Dr. Marie-Noële Croteau, co-examiner  
Dr. Renata Behra, co-examiner

2014

## Summary

Cerium oxide nanoparticles (CeO<sub>2</sub> NP) are increasingly used in industrial applications and are expected to be released into the aquatic environment. With their release into the environment an exposure of organisms becomes likely. Thus effects of CeO<sub>2</sub> NP to organisms have to be carefully evaluated to be able to assess risks. In this study the behavior of CeO<sub>2</sub> NP in algae growth medium was examined. Further the effects to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* as a model organism, were investigated in short and long term exposures. To discriminate between effects from CeO<sub>2</sub> NP and dissolved cerium(III) co-occurring in CeO<sub>2</sub> NP suspensions, experiments were also performed with Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. The role of the cell wall of *C. reinhardtii* as a barrier for uptake and its influence on the sensitivity was evaluated by testing both, the wild type and the cell wall free mutant of *C. reinhardtii*.

Strong agglomeration of CeO<sub>2</sub> NP was observed in algae media at physiological pH. With the addition of phosphate CeO<sub>2</sub> NP were stabilized at pH 7.5 in exposure media. This effect was exploited to test CeO<sub>2</sub> NP dispersed with phosphate with a mean size of 140 nm and agglomerated in absence of phosphate. The level of dissolved cerium(III) in CeO<sub>2</sub> NP suspensions in all tested media was very low and between 0.1-27 nM. The effects of CeO<sub>2</sub> NP to *C. reinhardtii* and the role of dissolved cerium(III) on toxicity was assessed by measuring photosynthetic yield and intracellular reactive oxygen species (ROS) upon short term exposure. The photosynthetic yield of *C. reinhardtii* decreased as function of cerium(III) with EC<sub>50</sub> of 7.5 ± 0.84 μM for wild type and EC<sub>50</sub> of 6.3 ± 0.53 μM for the cell wall free mutant. The intracellular level of ROS increased upon exposure to cerium(III) but not upon exposure to CeO<sub>2</sub> NP. A slight decrease of photosynthetic yield was only measured upon exposure to the agglomerated CeO<sub>2</sub> NP at the highest concentrations (100 μM), while no effect was observed for dispersed CeO<sub>2</sub> NP. The low toxicity of agglomerated CeO<sub>2</sub> NP was attributed quantitatively to Ce<sup>3+</sup> ions co-occurring in the nanoparticle suspension. In case of dispersed CeO<sub>2</sub> NP, dissolved Ce<sup>3+</sup> was complexed with phosphate and thus not bioavailable. The sensitivity of the cell wall free mutant was comparable to that of the wild type. For both algae strains, a strong flocculation of cells was observed upon exposure to agglomerated CeO<sub>2</sub> NP.

Furthermore it was explored whether the short term exposure of CeO<sub>2</sub> NP and cerium(III) to *C. reinhardtii* results in uptake of cerium. Wash steps with fresh medium containing EDTA

were done to remove CeO<sub>2</sub> NP and Ce<sup>3+</sup> from algal surfaces. A concentration and time dependent increase of cellular CeO<sub>2</sub> NP was measured. Based on the calculated number of CeO<sub>2</sub> NP per cell, an internalization of CeO<sub>2</sub> NP in *C. reinhardtii* was excluded. The increase of cellular cerium was explained by a sorption of CeO<sub>2</sub> NP to the cell wall. For cerium(III) maximal cellular cerium concentrations of  $6.04 \times 10^{-4} \text{ mol L}_{\text{cell}}^{-1}$  in the wild type and  $9.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}_{\text{cell}}^{-1}$  in the cell wall free mutant of *C. reinhardtii* were measured after two hours of exposure. The increment of cellular cerium over time was in relation with the decrease of photosynthetic yield, which was similar in both algae strains. Competition experiments with calcium decreased the cellular cerium concentration in the wild type threefold, but toxicity did not decrease. In the cell wall free mutant cellular cerium concentrations and toxicity did not change in presence of calcium. The results indicated that cerium, which appeared as intracellular, was partly bound to the cell wall of the wild type. The slow uptake of cerium(III) indicated that no efficient transport routes are available in *C. reinhardtii*.

The effects of CeO<sub>2</sub> NP on the wild type and cell wall free mutant of *C. reinhardtii* were assessed in long term exposure over five days. Exponential growth of algae was maintained during exposure by exchanging the growth media and diluting the cell density every day. Growth, cell volume, photosynthetic yield and ATP content were measured at different time points during exposure. Controls and algae exposed to 10 μM agglomerated CeO<sub>2</sub> NP showed exponential growth in all subcultures. Exposed algae of both strains did not differ from the control in cell volume, photosynthetic yield and ATP content. No harmful effects of CeO<sub>2</sub> NP to the wild type and cell wall free mutant were observed in long term exposure.

In this work no direct effects of CeO<sub>2</sub> NP to the green alga *C. reinhardtii* were detected. The toxicity of CeO<sub>2</sub> NP was related to indirect effects of dissolved cerium(III). Moreover CeO<sub>2</sub> NP with a mean size of 140 nm were not internalized by algae. Cerium(III) was shown to be toxic to *C. reinhardtii* and to be taken up into the cells. Considering the detected effects of CeO<sub>2</sub> NP, the EC<sub>50</sub> values of cerium(III) and the predicted environmental concentration of CeO<sub>2</sub> NP, no effects on algae are expected to occur under environmental conditions.

## Zusammenfassung

Ceroxid Nanopartikel ( $\text{CeO}_2$  NP) kommen zunehmend in industriellen Anwendungen zum Einsatz und können so in die aquatische Umwelt gelangen. Mit ihrer Freisetzung in die Umwelt wird eine Exposition von Organismen erwartet. Um dadurch entstehende Risiken beurteilen zu können, ist es wichtig die Effekte von  $\text{CeO}_2$  NP auf Organismen genau zu untersuchen. In dieser Studie wurde das Verhalten von  $\text{CeO}_2$  NP in Wachstumsmedium für Algen bestimmt und Effekte auf den Modelorganismus *Chlamydomonas reinhardtii* in Kurz- und Langzeitexpositionen untersucht. Um zwischen Effekten der  $\text{CeO}_2$  NP und gelöstem Cer(III), welches in  $\text{CeO}_2$  NP Suspensionen vorkommt, unterscheiden zu können, wurden zusätzlich Expositionen mit  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$  durchgeführt. Die Rolle der Zellwand von *C. reinhardtii* als Barriere für die Aufnahme und deren Einfluss auf die Sensitivität wurde mit einer zellwandfreien Mutante und dem Wildtyp von *C. reinhardtii* getestet.

Bei physiologischen pH wurde eine starke Agglomerationen der  $\text{CeO}_2$  NP im Wachstumsmedium der Algen beobachtet. Durch Zugabe von Phosphat konnten  $\text{CeO}_2$  NP im Medium bei einem pH von 7,5 stabilisiert werden. Dieser Effekt wurde ausgenutzt um dispergierte  $\text{CeO}_2$  NP mit einer durchschnittlichen Größe von 140 nm in phosphathaltigem Medium und agglomerierte  $\text{CeO}_2$  NP in phosphatfreiem Medium zu untersuchen. Die Menge an gelöst vorliegendem Cer(III) in den  $\text{CeO}_2$  NP Suspensionen der verschiedenen Medien war sehr gering und lag zwischen 0.1 und 27 nM. Effekte der  $\text{CeO}_2$  NP auf *C. reinhardtii* und die Rolle von gelöstem Cer(III) auf die Toxizität wurde durch die Messung der Photosyntheserate und dem intrazellulären Level von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beurteilt. Hierbei verringerte sich die Photosyntheserate von *C. reinhardtii* mit steigender Cer(III) Konzentration, mit einem  $\text{EC}_{50}$  von  $7,5 \pm 0,84 \mu\text{M}$  für den Wildtyp und  $6,3 \pm 0,53 \mu\text{M}$  für die zellwandfreien Mutante. Die Menge an intrazellulären ROS erhöhte sich in Folge der Exposition zu Cer(III), nicht aber in Folge der Exposition mit  $\text{CeO}_2$  NP. Ein leichter Rückgang der Photosyntheserate erfolgte nur nach Exposition mit den höchsten Konzentrationen ( $>100 \mu\text{M}$ ) von agglomerierten  $\text{CeO}_2$  NP, während kein Effekt der dispergierten  $\text{CeO}_2$  NP gefunden wurde. Die geringe Toxizität der agglomerierten  $\text{CeO}_2$  NP konnte quantitativ auf die Konzentration an freien  $\text{Ce}^{3+}$  Ionen der phosphatfreien NP Suspension zurückgeführt werden. Im Gegensatz hierzu, waren in der dispergierten  $\text{CeO}_2$  NP Suspension keine  $\text{Ce}^{3+}$  Ionen bioverfügbar, da sie durch Phosphat komplexiert wurden. Die zellwandfreie Mutante

wies eine vergleichbare Sensitivität zum Wildtyp auf. Für beide Algenstämme wurde während der Exposition mit agglomerierten CeO<sub>2</sub> NP eine starke Flockung der Algenzellen beobachtet.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Kurzzeitexposition von *C. reinhardtii* mit CeO<sub>2</sub> NP und Cer(III) in einer Aufnahme von Cer resultiert. Es wurden Waschschriffe mit frischem Medium welches EDTA enthielt durchgeführt, um CeO<sub>2</sub> NP und Ce<sup>3+</sup> von der Algenoberflächen zu entfernen. Eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der, an die Zellen gebundenen, CeO<sub>2</sub> NP wurde gemessen. Basierend auf der berechneten Anzahl von CeO<sub>2</sub> NP pro Zelle wurde einer Internalisierung von CeO<sub>2</sub> NP in *C. reinhardtii* ausgeschlossen, wobei der gemessene Anstieg der Cer Konzentration durch eine Sorption von CeO<sub>2</sub> NP an die Zellwand erklärt wurde. Nach zweistündiger Exposition mit Cer(III) wurde eine maximale zelluläre Cer Konzentration von  $6,04 \times 10^{-4} \text{ mol L}_{\text{Zelle}}^{-1}$  im Wildtyp und  $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}_{\text{Zelle}}^{-1}$  in der zellwandfreien Mutante von *C. reinhardtii* gemessen. Die über die Expositionszeit ansteigende zelluläre Cer Konzentration stand im Zusammenhang mit der Abnahme der Photosyntheserate, welche in beiden Algenstämmen gleich war. Konkurrenzexperimente mit Calcium führten zu einer dreifach geringeren zellulären Cer Konzentration im Wildtyp, wobei die Toxizität unverändert blieb. In der zellwandfreien Mutante trat keine Veränderung der zellulären Cer Konzentration und der Toxizität unter Beigabe von Calcium auf. Dies deutete darauf hin, dass Cer, welches als zellulär vorliegend angenommen wurde, zum Teil an der Zellwand des Wildtyps gebunden vorlag. Die langsame Aufnahme von Cer lässt darauf schließen, dass keine effizienten Transportwege für Cer in *C. reinhardtii* vorhanden sind.

In Langzeitexperimenten wurde der Effekt von CeO<sub>2</sub> NP auf den Wildtyp und die zellwandfreie Mutante von *C. reinhardtii* über einen Zeitraum von fünf Tagen untersucht. Hierfür wurden die Algen durch täglichen Medienwechsel und Verdünnung der Zellzahl in der exponentiellen Wachstumsphase gehalten. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Größe, Zellvolumen, Photosyntheserate und ATP-Gehalt der Algen bestimmt. In den Subkulturen der Kontrolle und den Algen, welche mit 10 µM CeO<sub>2</sub> NP exponierten wurden, konnte exponentielles Wachstum festgestellt werden. Verglichen mit den Kontrollen, zeigten die exponierten Algen beider Stämme keine Unterschiede bezüglich Zellvolumen, Photosyntheserate und ATP-Gehalt. Es konnten keine schädlichen Effekte der CeO<sub>2</sub> NP auf den Wildtyp oder die zellwandfreie Mutante während einer Langzeitexposition festgestellt werden.

In dieser Arbeit konnten keine direkten Effekte der CeO<sub>2</sub> NP Exposition auf die Grünalge *C. reinhardtii* festgestellt werden. Die aufgetretene Toxizität der CeO<sub>2</sub> NP wurde gelöstem Cer(III) zugeschrieben. CeO<sub>2</sub> NP mit einer durchschnittlichen Größe von 140 nm wurden nicht von den Algen aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass Cer(III) toxisch auf *C. reinhardtii* wirkte und in die Zellen aufgenommen wurde. In Anbetracht der gemessenen Effekte von CeO<sub>2</sub> NP, der EC<sub>50</sub>-Werte von Cer(III) sowie den vorhergesagten Umweltkonzentration von CeO<sub>2</sub> NP, werden keine Auswirkungen der CeO<sub>2</sub> NP auf Algen unter Umweltbedingungen erwartet.